

Caractérisation des gènes de virulence des souches d'*Escherichia coli* isolées de veaux souffrant de diarrhée dans la commune de Nikki au Bénin

Kadoéito Cyrille Boko ^{1*} Kétomon Pierre Challaton ¹
Chakirath Folakè Arikè Salifou ² Nestor Oscar Aguidissou ¹
Jean-Noël Duprez ³ Damien Thiry ³ Jacques Georges Mainil ³
Souaïbou Farougou ¹

Mots-clés

Veau, trouble digestif, *Enterobacteriaceae*, pouvoir pathogène, Bénin

© K.C. Boko et al., 2024



<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Submitted: 27 June 2023

Accepted: 28 March 2024

Online: 10 June 2024

DOI: 10.19182/remvt.37197

Résumé

La diarrhée est l'une des principales pathologies rencontrées dans les élevages de bovins au Bénin. Les veaux, premiers maillons de la chaîne, en sont les plus atteints. L'objectif de cette étude était d'évaluer la présence des gènes de virulence dans les souches d'*Escherichia coli* susceptibles de provoquer la diarrhée chez les veaux ainsi que leurs profils de résistance aux antimicrobiens usuels. Pour cela, 106 veaux ont fait objet d'un suivi pendant deux mois après leur naissance dans la commune de Nikki. Au total, 33 échantillons de matières fécales ont été prélevés directement du rectum de 33 veaux atteints de diarrhée et soumis à des analyses bactériologiques. Tous les prélèvements réalisés étaient positifs à *E. coli*. La caractérisation des souches d'*E. coli* isolées pour la présence des gènes et facteurs de virulence *stx1*, *stx2*, *eae*, *sta*, F41 et F5, a révélé la présence du gène *stx1* uniquement avec un taux de 63,64 %. La résistance des souches d'*E. coli* aux antibiotiques les plus utilisés au Bénin a été testée : la doxycycline (taux de résistance de 70 %), l'amoxicilline + acide clavulanique (50 %) et la colistine (50 %). Des études ultérieures sont nécessaires afin de procéder au typage sérologique et au séquençage du génome des souches d'*E. coli*. Il serait également nécessaire d'étendre l'échantillonnage aux autres régions du Bénin, afin de mieux évaluer le statut des élevages bovins vis-à-vis de ces souches d'*E. coli* isolées chez les veaux et ainsi identifier un éventuel risque zoonotique.

■ Comment citer cet article : Boko K.C., Challaton K.P., Salifou C.F.A., Aguidissou N.O., Duprez J.N., Thiry D., Mainil J.G., Farougou S., 2024. Caractérisation des gènes de virulence des souches d'*Escherichia coli* isolées de veaux souffrant de diarrhée dans la commune de Nikki au Bénin. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, 77: 37197, doi: 10.19182/remvt.37197

■ INTRODUCTION

Dans la plupart des pays du monde, la diarrhée est la maladie des veaux la plus courante signalée par les éleveurs, pouvant engendrer

des pertes économiques sévères et constituant l'une des principales causes de mortalité chez les veaux nouveau-nés (Zouagui et al., 2017 ; Smail et al., 2018 ; Monney et al., 2020). Des taux de diarrhées compris entre 10 % et 70 % ont été rapportés par Wudu et al. (2008) dans les élevages bovins à travers le monde et des taux de mortalité variant entre 1,5 % et 50 % par Mellado et al. (2014).

Cette pathologie peut être à l'origine de déshydratation, de fatigue, d'hypothermie et d'une perturbation des fonctions vitales pouvant être létale. Les veaux qui survivent aux formes graves présentent tout au long de leur vie des performances moins intéressantes que celles des veaux ayant toujours été en bonne santé. Cette baisse de productivité ajoutée aux coûts des traitements entraîne un manque à gagner important pour l'éleveur. De nombreuses études ont été effectuées sur les origines des diarrhées des veaux. Les causes de ce

1. Unité de recherche sur les maladies transmissibles, Laboratoire de Recherches en Biologie Appliquée, Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi, Université d'Abomey-Calavi, Cotonou, Bénin.

2. Laboratoire de Biotechnologie Animale et de Technologie des Viandes, Département de Production et Santé Animales, Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi, Université d'Abomey-Calavi, Cotonou, Bénin.

3. Service de Bactériologie vétérinaire, Département des Maladies Infectieuses et parasitaires, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, Liège, Belgique.

* Auteur pour la correspondance

Tél : +229 66855454 ; Email : cyrilleboko@yahoo.fr

syndrome font intervenir des facteurs non infectieux, comme le mode d'élevage, le manque d'attention particulière aux veaux nouveau-nés, l'échec du transfert passif de l'immunité, la traite précoce des vaches (Koutinhoun et al., 2010 ; Monney et al., 2020), et des facteurs infectieux qui peuvent être de nature bactérienne (*Escherichia coli*), virale (coronavirus et rotavirus) ou parasitaire (*Cryptosporidium parvum*) (Smail et al., 2018).

Escherichia coli (*E. coli*) a été identifiée comme l'un des agents pathogènes les plus impliqués dans les diarrhées néonatales des veaux, entraînant une morbidité et une mortalité élevées dans le monde (Ryu et al., 2020). Ces bactéries font partie du microbiote intestinal normal des hommes et de la plupart des mammifères. Cependant, certaines souches ont été qualifiées d'*E. coli* entéropathogène au sens large car ayant acquis des facteurs de virulence actifs à hauteur de l'intestin (Bost van et al., 2003 ; Nguyen et al., 2011). Parmi ces *E. coli* entéropathogènes au sens large, celles entérotoxigènes (ETEC) représentent l'archétype des souches pathogènes à tropisme intestinal. Afin de coloniser l'intestin des animaux, elles produisent des adhésines fimbriaires dont F4 (ou K88), F5 (ou K99), F6 (ou 987P), F17, F18 (ou F107) et/ou F41. Elles exercent leur action délétère par la production d'entérotoxines thermostables (STa et/ou STb) ou thermolabiles (LT) qui provoquent une hypersécrétion d'eau et d'électrolytes par les entérocytes dans la lumière intestinale (Gyles et Fairbrother 2010 ; Mainil, 2013). Chez les veaux, les souches sont majoritairement productrices d'adhésines F5 et/ou F41 et de toxines STa (Mainil et Fairbrother, 2014).

D'autres souches à tropisme intestinal ont été décrites. Parmi elles, on peut citer les *E. coli* attachantes et effaçantes (AEEC) (Moxley et Smith, 2010 ; Mainil, 2013) ainsi nommées car elles provoquent une lésion histologique des entérocytes dénommée « lésion d'attachement et d'effacement (AE) » avec notamment la synthèse d'une adhésine présente dans la membrane externe de la bactérie (intimine) et codée par le gène *eae*. Les souches AEEC comprennent les *E. coli* entéropathogènes au sens strict (EPEC) et des *E. coli* shigatoxigènes (STEC) qui produisent aussi des toxines de Shiga (*Stx1*, *Stx2*) codées par les gènes *stx1* et *stx2* (Nguyen et al., 2011 ; Bessalah et al., 2016 ; Habets et al., 2020 ; Habets et al., 2022). Les souches AEEC sont à l'origine d'entérites et de diarrhées chez les veaux jusqu'à l'âge de trois mois suite à la réaction inflammatoire que les lésions AE engendrent. Les toxines *Stx* sont, par contre, inactives chez les veaux, alors qu'elles induisent des lésions vasculaires du colon, rénales et cérébrales chez l'homme, provoquant des diarrhées hémorragiques et le syndrome hémolytique-urémique (Mariani-Kurkdjian et Bingen, 2012 ; Mainil et Fairbrother, 2014).

Au Bénin, les diarrhées constituent la première contrainte sanitaire dans les élevages de bovins (Koutinhoun et al., 2010 ;). Elles ont une incidence primordiale sur la mortalité des veaux avant et peu après le sevrage. Celle-ci a été estimée à 21 % et 17 % respectivement en 1996 et 1997 sur des bovins Borgou de la ferme d'élevage de l'Okpara, dans le département du Borgou au nord-Bénin (Youssao et al., 2001). Le veau étant le premier maillon de la production de viande bovine, sa survie garantit aux éleveurs une activité durable grâce à une productivité accrue et une rentabilité économique des élevages. Cependant, il n'existe actuellement aucune étude publiée sur l'identité et la prévalence des différentes *E. coli* pathogènes responsables des diarrhées observées chez les veaux dans les élevages bovins au Bénin.

L'objectif de cette étude visait à contribuer à combler ce manque de connaissances scientifiques en déterminant la prévalence des gènes de virulence et les profils de résistance aux antibiotiques les plus utilisés au Bénin des souches d'*E. coli* isolées à partir de la matière fécale de veaux diarrhéiques dans la commune de Nikki au nord du Bénin.

■ MATERIEL ET METHODES

Zone d'étude

L'étude a été réalisée en 2016 dans la commune de Nikki située à environ 530 km de Cotonou (capital économique du Bénin). Localisée dans le département du Borgou, cette commune est limitée au nord par Kalalé, au sud par Pèrèrè et à l'ouest par Bembéréké et N'Dali. À l'est, Nikki, avec de nombreuses autres communes du département du Borgou (notamment Tchaourou, Pèrèrè et Kalalé), fait office de frontière avec la République fédérale du Nigeria (figure 1).

Echantillonnage et isolement des souches d'E. coli

Cent six (106) veaux ont été suivis dès leur naissance et jusqu'à l'âge de 2 mois pour vérifier la présence de diarrhée dans 29 troupeaux dans les arrondissements de Biro (28 veaux suivis), Nikki centre (33), Ouénou (24) et Tasso (21) de la commune de Nikki. Chaque exploitation a été visitée deux fois par semaine à partir de la naissance des veaux pour faire des prélèvements de matière fécale sur ceux souffrant de diarrhée. Les échantillons ont été prélevés directement dans le rectum des veaux diarrhéiques avec des écouvillons stériles. Chaque veau a été prélevé une seule fois. Les prélèvements conservés dans une glacière munie d'un accumulateur de froid ont été envoyés au Laboratoire de Diagnostic Vétérinaire et de Séro-surveillance de Parakou (LADISERO) pour être analysés immédiatement. Les prélèvements ont été ensemencés sur gélose Columbia (Oxoid, Royaume-Uni) au sang de mouton et sur gélose MacConkey, puis incubés à l'étuve à 37°C pendant 24 heures. Trois colonies lactose-positives ont été prélevées de la gélose MacConkey puis repiquées dans une gélose éosine bleu de méthylène (EMB). Deux colonies présentant des reflets métalliques sur gélose EMB ont été considérées comme étant des colonies d'*E. coli* et ont subi des tests d'orientation (mobilité, catalase, oxydase, coloration de Gram), puis ont été identifiées par galerie biochimique API 20^E (BioMérieux). Les souches identifiées d'*E. coli* ont été repiquées sur gélose Luria-Bertani (LB), puis envoyées au Département des Maladies Infectieuses et Parasitaires de l'Université de Liège (permis d'importation n°1425156 du 31-01-2017) pour y rechercher des gènes de virulence. Les souches ont été conservées dans des cryotubes à -80°C dans du glycérol stérile à 40 %.

Extraction d'ADN

Des géloses LB ont été ensemencées avec un échantillon de chaque cryotube et incubées à 37°C pendant 24 h. Une des colonies obtenues pour chaque souche a été ensuite repiquée dans un bouillon LB (5 ml/tube) et cultivée sous agitation pendant une nuit à 37°C. Ensuite, 2 ml

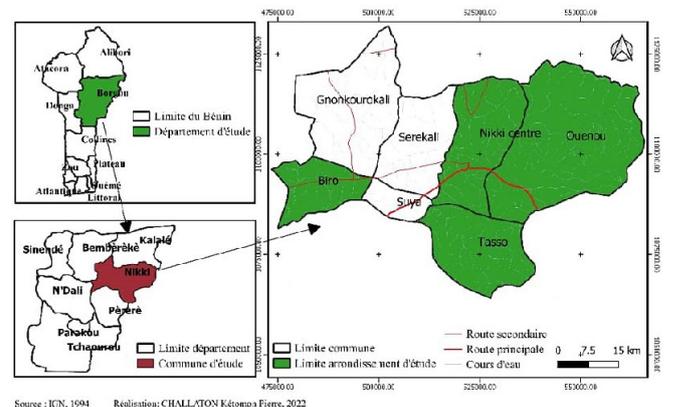


Figure 1 : Localisation de la zone d'étude // Location of the study area

de la culture ont été transférés dans un tube puis centrifugés à 4°C à 13 000 tours pendant 5 min. Après rejet du surnageant, le culot a été remis en suspension dans 250 µl de tampon Tris-EDTA (TE). Les bactéries ont été lysées par ébullition à 100°C pendant 10 min. Le lysat a été à nouveau centrifugé à 4°C à 13 000 tours pendant 5 min. Le surnageant a été transféré dans un nouveau tube Eppendorf pour la réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

Détection des gènes de virulence d'E. coli

La présence des gènes *stx1*, *stx2* et *eae* a été recherchée sur les souches d'E. coli par PCR uniplex adaptée aux méthodes décrites dans les publications (Cebula et al., 1995 ; Oswald et al., 2000). La présence des gènes codant pour l'entérotoxine *sta* et pour les adhésines fimbriaires F41 et F5 a été recherchée en PCR triplex, comme décrit par Shams et al. (2012).

Analyse de l'antibiorésistance

La procédure de test de la sensibilité aux antimicrobiens avec diffusion en gélose Muller-Hinton (Axonlab, Belgique) par la méthode des disques de Bauer et al. (1966), a été utilisée pour 14 antibiotiques ou associations d'antibiotiques les plus utilisés par les agents vétérinaires travaillant dans les localités de la zone d'étude : doxycycline (30 µg), amoxicilline + acide clavulanique (30 µg), triméthoprime-sulfamidés (25 µg), cefoxitine (30 µg), nitrofurantoïne (300 µg), acide nalidixique (30 µg), enrofloxacin (5 µg), ciprofloxacine (5 µg), chloramphénicol (30 µg), aztréonam (30 µg), céfotaxime (5 µg), azitromicine (15 µg), piperacillin-tazobactam (36 µg) et gentamicine (10 µg).

Cette méthode des disques n'étant pas adaptée pour tester la colistine, la méthode décrite par Joffin et Leyral (2001) a été utilisée pour ce dernier antibiotique : Une plaque de 96 puits a été utilisée pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI). Ensuite, 50 µl de bouillon Mueller-Hinton ont été introduits à l'aide d'une pipette automatique à embout stérile dans les cupules des colonnes 1 à 12. Puis 50 µl de la solution d'antibiotique diluée dans du bouillon Mueller-Hinton à la concentration de 256 µg.ml⁻¹ ont été introduits dans la cupule 1. Il a été reporté 50 µl de mélange de la cupule 1 à la cupule 11 (dilution de 2 en 2) à l'aide d'une pipette automatique à embout stérile. Les dilutions ainsi obtenues allaient de 128 à 0,125 µg.ml⁻¹. Il a été ajouté 50 µl d'inoculum dans du bouillon Mueller-Hinton (les dilutions étaient alors de 64 à 0,0625 µg.ml⁻¹). Les concentrations utilisées sont celles préconisées dans les lignes directrices du Comité européen sur les tests de sensibilité aux antimicrobiens (EUCAST, 2021). Les plaques ont été incubées pendant 24 h à la température optimale de la souche puis observées pour y détecter une éventuelle croissance dans chaque cupule (ou un dépôt au fond de la cupule). La CMI correspondait à la concentration de la cupule ne présentant pas de croissance.

Analyse statistique

Afin de calculer la prévalence des diarrhées et le taux de résistances des souches bactériennes identifiées, les formules suivantes ont été utilisées :

$$\text{Prévalence des diarrhées} = \frac{\text{Nombre de veaux ayant présenté la diarrhée} \times 100}{\text{Nombre total de veaux suivis}}$$

$$\text{Taux de résistance} = \frac{\text{Nombre d'échantillons positifs pour la résistance} \times 100}{\text{Nombre total d'échantillons analysés}}$$

■ RESULTATS

Prévalence des veaux atteints de diarrhée

Sur les 106 veaux suivis, 33 (31 %) souffraient de diarrhées : 7 veaux (21 %) âgés de 0 à 15 jours ; 17 veaux (52 %) entre 2 et 4 semaines ;

1 veau (3 %) entre 4 et 6 semaines ; et 8 veaux (24 %) entre 6 et 8 semaines (tableau I). Les proportions des veaux malades parmi la totalité des veaux suivis à Biro, Nikki centre, Ouénou et Tasso, étaient respectivement de 29 %, 33 %, 29 % et 33 % (tableau II).

Prévalence des souches d'E. coli et des gènes de virulence selon la tranche d'âge des veaux

Au total, 33 souches d'E. coli ont été analysées (soit une souche par veau diarrhéique) par tests PCR. Les résultats ont montré que 21 de ces 33 souches d'E. coli (soit 63,64 %) portaient un gène de virulence, à savoir le gène *stx1* : 6 souches isolées à partir des 7 veaux âgés de 0 à 15 jours ; 10 souches isolées des 17 veaux âgés de 2 à 4 semaines ; 1 souche isolée du veau entre 4 et 6 semaines ; et 4 souches isolées des 8 veaux de 6 et 8 semaines. La recherche des gènes *eae*, *stx2*, *sta*, F41 et F5 a été négative pour toutes les souches d'E. coli analysées (tableau III).

Tableau I : Nombre de veaux atteints de diarrhée selon la tranche d'âge et la localité /// Number of calves with diarrhea by age group and locality

Localité	Effectifs				Effectif total et proportion (n=33)
	Biro (n=8)	Nikki centre (n=11)	Ouénou (n=7)	Tasso (n=7)	
Âge					
0-15 jours	3	0	3	1	7 (21 %)
15-30 jours	4	7	2	4	17 (52 %)
30-45 jours	0	1	0	0	1 (3 %)
45-60 jours	1	3	2	2	8 (24 %)

Tableau II : Proportion des veaux souffrant de diarrhée par localité /// Proportion of calves with diarrhoea by locality

Localité	Veaux suivis		Veaux diarrhéiques	
	Effectif (n)		Effectif (n)	(%)
Biro	28		8	29
Nikki centre	33		11	33
Ouénou	24		7	29
Tasso	21		7	33
Total	106		33	31

Tableau III : Effectifs des souches d'E. coli portant des gènes codant pour des facteurs de virulence /// Numbers of E. coli strains carrying gene coding for virulence factors

Âge	N	<i>eae</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>sta</i>	F41	F5
0 – 15 j	7	-	6	-	-	-	-
15 – 30 j	17	-	10	-	-	-	-
30 – 45 j	1	-	1	-	-	-	-
45 – 60 j	8	-	4	-	-	-	-
Total	33	-	21	-	-	-	-

- : absence

Sensibilité des isolats d'E. coli aux antimicrobiens

Les taux de résistance et les valeurs de la CMI obtenus à partir des souches isolées variaient selon la molécule d'antibiotique testée (figure 2) : doxycycline (70 %), amoxicilline et acide clavulanique (50 %), colistine (50 %), triméthoprim sulfamides (29 %), cefoxitine (20 %), nitrofurantoïne (20 %), acide nalidixique (20 %), enrofloxacin (12 %), ciprofloxacine (8 %) et chloramphénicol (4 %). Par contre, toutes les souches ont été sensibles à l'aztréonam (0 %), au céfotaxime (0 %), à l'azitromicine (0 %), au piperacillin tazobactam (0 %) et à la gentamicine (0 %).

■ DISCUSSION

L'étude a révélé un taux de 31 % des veaux âgés de 0 à 2 mois atteints de diarrhée dans l'échantillon suivi. Ce taux est conforme à celui issu des travaux de Koutinhouin et al. (2010) selon lesquels les diarrhées sont d'importantes contraintes sanitaires rencontrées par les éleveurs dans les élevages bovins au Bénin. Ce taux est supérieur à celui de 14,5 % rapporté par Olaogun et al (2016) pour des veaux âgés de 0 à 6 mois au Nigéria dans les Etats d'Oyo et d'Ogun. La prévalence de diarrhées, relativement importante révélée par notre étude, pourrait être dues aux pratiques non hygiéniques des éleveurs et au manque de suivi sanitaire dans ces élevages, surtout chez les très jeunes veaux. Les prévalences des diarrhées diminuent en effet avec l'âge, ce qui rejoint les observations de Akam et al. (2004) selon lesquelles la fréquence d'apparition de la diarrhée chez les veaux diminue avec leur âge. Cette diminution semble être liée principalement, à l'installation de l'immunité acquise des veaux : plus les veaux sont âgés, meilleure est leur immunité vis-à-vis des agents du milieu extérieur du fait d'une exposition répétée (Akam et al., 2004).

Parmi les causes bactériennes de la diarrhée chez les veaux, *E. coli* est l'espèce la plus incriminée par de nombreux chercheurs (Smail et al., 2018 ; Ryu et al., 2020). Dans cette étude, elle a, d'ailleurs, été isolée de tous les échantillons analysés. Ce taux est largement supérieur à ceux rapportés par El-Tawab et al. (2017) et Mahmoud et al. (2019), respectivement 47 % et 56 % de prévalence, lors d'études similaires. Cependant, la présence d'*E. coli* chez tous les veaux souffrant de diarrhée peut aussi être due au fait qu'elle est présente naturellement dans la flore intestinale de la plupart des mammifères et des humains (Mannan et al., 2021). Cependant, toutes les souches d'*E. coli* isolées dans les échantillons de notre étude ne sont certainement pas uniquement liées au microbiote intestinal « normal », car certaines souches d'origine exogène peuvent

être pathogènes. La présence de gènes codant pour des facteurs de virulence chez ces souches est un argument en faveur de cette hypothèse.

La recherche des gènes et des facteurs de virulence (*stx1*, *stx2*, *eae*, *sta*, F41 et F5) sur les 33 souches d'*E. coli* isolées dans notre étude a montré la présence du gène *stx1* uniquement avec une prévalence de 64 %. L'absence des gènes *stx2* dans cette étude est conforme avec les résultats de plusieurs travaux de recherche (Moxley et Smith, 2010 ; Mahmoud et al, 2019) qui ont montré que la plupart des souches STEC isolées chez les veaux atteints de diarrhée possèdent le gène *stx1* et rarement *stx2*, alors que les souches positives pour *stx2* sont les types dominants chez les veaux sains (Orden et al., 1998). Ces mêmes observations ont été faites chez les petits ruminants (Bhat et al., 2008 ; Wani et al., 2009). Il faut aussi noter l'absence des facteurs de virulence des souches ETEC, alors que celles-ci sont bien documentées en Europe et en Amérique comme étant responsables de diarrhées du veau nouveau-né (Mainil et Fairbrother, 2014).

Cependant, les souches STEC associées aux diarrhées des veaux possèdent, en plus du gène *stx1*, le gène *eae* associé à la production des lésions AE. Ces souches appartiennent à un petit nombre de sérotypes : O5:H-, O26:H11, O80:H2, O111:H-, O118:H16 (Moxley et Smith, 2010 ; Mainil et Fairbrother 2014 ; Mahmoud et al., 2019). Le sérotypage et le séquençage du génome des 21 souches identifiées dans notre étude permettront de confirmer ou non si celles-ci sont potentiellement diarrhéogènes, même si le gène *eae* n'a pas été détecté. En effet, d'une part, les gènes *stx* peuvent être présents dans des souches appartenant à d'autres pathotypes suite aux transferts par transduction des phages porteurs de ces gènes *stx*, comme pour la souche entéroaggrégative O104:H4 responsable d'une épidémie en Allemagne en 2011 (Piérard et al., 2012). D'autre part, des souches appartenant à des sérotypes moins fréquents, comme O157:H7, peuvent également être isolées chez le veau (Mainil et Fairbrother, 2014). Les résultats de sérotypage et de séquençage du génome des 21 souches étudiées permettront aussi d'évaluer leur risque zoonotique.

Des cas d'infections humaines à *E. coli* O157:H7 ont été rapportés par Lupindua (2018) dans plusieurs pays africains. Ces infections n'ont pas encore été évaluées au Bénin. L'occurrence et la persistance des STEC dans les élevages constituent une menace de transmission des souches pathogènes à l'homme. Des travaux ultérieurs sont indispensables pour approfondir cet aspect.

Les souches d'*E. coli* présentent des profils de résistance pour 10 molécules d'antibiotique sur les 15 testées. Ces résultats indiquent clairement

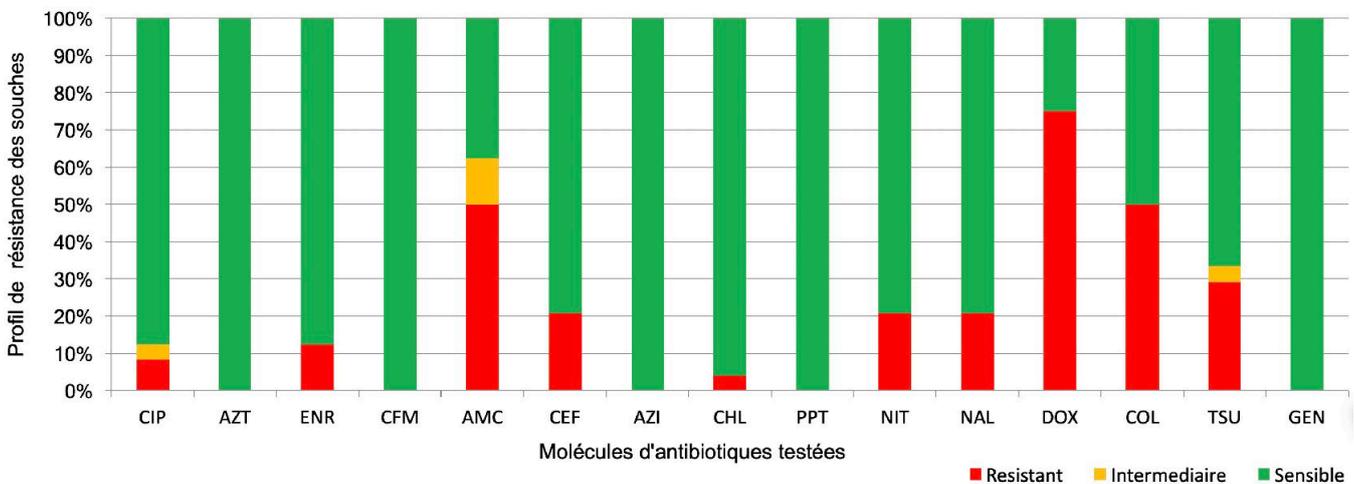


Figure 2 : Profil de résistance des 21 souches d'*E. coli* porteuses du gène *stx1* à 15 molécules d'antibiotiques // *Resistance profile of 21 stx1-positive E. coli strains to 15 antibiotic molecules*

LEGENDE/ AMC : amoxicilline et acide clavulanique, AZI : azitromicine, AZT : aztréonam, CEF : cefoxitine, CFM : céfotaxime, CHL : chloramphénicol, CIP : ciprofloxacine, COL : colistine, DOX : doxycycline, ENR : enrofloxacin, GEN : gentamicine, NAL : acide nalidixique, NIT : nitrofurantoïne, PPT : piperacillin-tazobactam, TSU : triméthoprim sulfamides

qu'il existe une antibiorésistance dans les élevages suivis par cette étude. Les taux de résistance les plus élevés ont été observés pour les antibiotiques suivants : doxycycline (70 %), l'amoxicilline-acide clavulanique (50 %) et la colistine (50 %). Les souches présentent des profils de résistance variant de 4 % à 29 % aux autres molécules testées. Les taux de résistance à la doxycycline relativement élevés se justifieraient par le fait qu'il s'agit des antibiotiques les plus utilisés dans les élevages bovins au Bénin (Mensah et al., 2019). L'émergence de ces profils de résistance pourrait aussi s'expliquer par le fait que la plupart des éleveurs ne consultent pas de vétérinaire pour l'administration des antibiotiques et/ou n'adaptent jamais la posologie au poids des bovins traités (Mensah et al., 2019). Des taux similaires de résistance aux antibiotiques de la classe des tétracyclines (donc de la même famille que la doxycycline) ont été obtenus par Fayemi et al. (2021) au Nigéria sur des *E. coli* isolées à partir de viande fraîche de bœuf et de produits carnés transformés prêts à consommer, ainsi qu'en Afrique du Sud par Iweriebor et al. (2015) sur des *E. coli* isolées issues de matières fécales de bovins laitiers. Les taux de résistance relativement élevés aux antibiotiques les plus utilisés dans les élevages bovins au Bénin montrent l'importance et l'urgence pour les services vétérinaires de sensibiliser les éleveurs aux bonnes pratiques vétérinaires et aux risques liés à une utilisation non judicieuse des antibiotiques.

■ CONCLUSION

Cette étude est la première au Bénin à avoir pu identifier des gènes de virulence de souches d'*E. coli* isolées chez des veaux souffrant de diarrhée et estimer leur niveau de résistance aux antimicrobiens les plus utilisés dans les élevages bovins. Ainsi 21 souches ont été identifiées comme porteuses de gènes de virulence. Néanmoins, pour consolider ces résultats, un échantillonnage plus important s'avère nécessaire. Ces travaux pourraient ainsi être étendus à l'ensemble des régions du Bénin afin d'identifier d'autres gènes de virulence des souches d'*E. coli* présentes dans les élevages. Il serait également essentiel d'effectuer des recherches supplémentaires sur le typage sérologique, voire le séquençage du génome, pour une identification complète des souches d'*E. coli*. Enfin, il est fondamental que les éleveurs adoptent des pratiques visant à réduire l'exposition des veaux nouveau-nés aux agents infectieux comme celle de séparer les veaux malades de leur mère, de nettoyer soigneusement les équipements, de réduire le stress des vaches et des veaux ou de surveiller la prise du colostrum dans les 24 h après le vêlage.

Remerciements

Les auteurs remercient les éleveurs pour avoir autorisé la réalisation des prélèvements des échantillons dans leurs troupeaux et les autorités du développement rural pour avoir facilité le contact avec les éleveurs. Ils remercient également le personnel du Laboratoire de Diagnostic Vétérinaire et de Séro-surveillance de Parakou (LADISERO) pour avoir permis la réalisation des premières analyses dans le laboratoire.

Conflits d'intérêts

L'étude a été réalisée sans conflit d'intérêts.

Déclaration du financement

Cette recherche n'a bénéficié d'aucune subvention spécifique de la part d'un organisme de financement du secteur public, commercial ou à but non lucratif.

Déclaration des contributions des auteurs

KPC a réalisé le prélèvement d'échantillons sur le terrain et les analyses statistiques. KCB a écrit le protocole, a réalisé les analyses au Bénin avec les aides de CFAS et de NOA, et a rédigé la première version de cet article. J-ND a réalisé les analyses en Belgique et DT et JGM ont examiné de manière critique le manuscrit. SF a coordonné et

a contribué à la révision critique du manuscrit. Tous les auteurs ont lu et approuvé la soumission et la version finale du manuscrit.

Ethique de la recherche

Le protocole d'étude a été évalué et approuvé par l'équipe de recherche et les autorités responsables du lieu où le travail a été effectué (Direction Départementale de l'Agriculture, de l'Élevage et de la Pêche du Borgou). Les éleveurs ont été informés des objectifs de l'étude et ont donné leur accord pour la réalisation des prélèvements. Les prélèvements de matières fécales ont été réalisés sur des animaux souffrant de troubles intestinaux en conditions normales d'élevage, par un para-professionnel vétérinaire formé aux méthodes de prélèvements respectueuses du bien-être des animaux.

REFERENCES

- Akam A., Khelef D., Kaidi R., Othmani A., Lafri M., TaliMaamar H., Rahal K., et al., 2004. Fréquences d'isolement de *Cryptosporidium parvum*, d'*Escherichia coli* K99 et de *Salmonella* spp. chez les veaux diarrhéiques et non diarrhéiques dans six fermes laitières de la Mitidja d'Algérie (Résultats préliminaires). *Sci. Parasitol.*, **5** (1-2): 13-21
- Bessalah S., Fairbrother J.M., Salhi I., Vanier G., Khorchani T., Seddik M.M., Hammadi M., 2016. Antimicrobial resistance and molecular characterization of virulence genes, phylogenetic groups of *Escherichia coli* isolated from diarrheic and healthy camel-calves in Tunisia. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **49**: 1-7, doi: 10.1016/j.cimid.2016.08.008
- Bhat M., Nishikawa Y., Wani S., 2008. Prevalence and virulence gene profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and enteropathogenic *Escherichia coli* from diarrhoeic and healthy lambs in India. *Small Rumin. Res.*, **75** (1): 65-70, doi: 10.1016/j.smallrumres.2007.08.006
- Bost Van S., Jacquemin E., Oswald E., Mainil J., 2003. Multiplex PCRs for Identification of Necrotogenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, **41** (9): 4480-4482, doi: 10.1128/JCM.41.9.4480-4482.2003
- Bauer A.W., Kirby W.M., Sherris J.C., Turck M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, **45**: 493-496, doi: 10.1093/ajcp/45.4_ts.493
- Cebula T.A., Payne W.L., Feng P., 1995. Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157: H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **33** (1): 248-250, doi: 10.1128/jcm.33.1.248-250.1995
- El-Tawab A., Ashraf A., Hofy F.I., Mohamed S.R., Salim R.A., 2017. Bacteriological and molecular studies on some bacterial agents from neonatal calf diarrhea. *Benha Med. J.*, **33** (2): 465-475, doi: 10.21608/bvmj.2017.30596
- EUCAST, 2021. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. <https://www.eucast.org> (consulté le 22 mai 2022)
- Fayemi O.E., Akanni G.B., Elegbeleye J.A., Aboaba O.O., Njage P.M., 2021. Prevalence, characterization and antibiotic resistance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups isolated from fresh beef and locally processed ready-to-eat meat products in Lagos, Nigeria. *Int. J. Food Microbiol.*, **347**: 109191, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109191
- Gyles C.L., Fairbrother J.M., 2010. *Escherichia coli*. In: Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals, (Eds. Gyles C.L., Prescott J.F., Songer J.G., Thoen C.O.), Wiley-Blackwell, Ames, IA, USA, 267-308, doi: 10.1002/9780470958209.ch15
- Habets A., Engelen F., Duprez J-N., Devleeschauwer B., Heyndrickx M., De Zutter L., Thiry D., et al., 2020. Identification of Shiga toxin-producing and Enteropathogenic *Escherichia coli* Serotypes in Healthy Young Dairy Calves in Belgium by Recto-Anal Mucosal Swabbing. *Vet. Sci.*, **7** (4): 167, doi: 10.3390/vetsci7040167
- Habets A., Touzain F., Lucas P., Thi Thu Huong N., Iguchi A., Crombé F., Korsak N., et al., 2022. Identification of Five Serotypes of Enteropathogenic *Escherichia coli* from Diarrheic Calves and Healthy Cattle in Belgium and Comparative Genomics with Shiga toxin-producing *E. coli*. *Vet. Sci.*, **9** (9): 492, doi: 10.3390/vetsci9090492
- Iweriebor B.C., Iwu C.J., Obi L.C., Nwodo U.U., Okoh A.I., 2015. Multiple antibiotic resistances among Shiga toxin producing *Escherichia coli* O157 in feces of dairy cattle farms in Eastern Cape of South Africa. *BMC Microbiol.*, **15** (1): 1-9, doi: 10.1186/s12866-015-0553-y
- Joffin J.N., Leyral G., 2001. Microbiologie technique : 1-Dictionnaire des techniques, 3^{ème} édition, Centre Régional de Documentation Pédagogique (CRDP) d'Aquitaine, Bordeaux, France, 320 p.
- Koutinhoun G., Youssao A., Kpodekon T., Gantoli Y., 2010. Influence de la traite précoce des vaches sur la croissance pondérale et l'état sanitaire des veaux en élevage traditionnel: cas de la zone périurbaine de Natitingou (Bénin). *Livest. Res. Rural. Dev.*, **22** (2).

- Lupindua A.M., 2018. Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 in Africa in review. *S. Afr. J. Infect. Dis.*, **33** (1): 24-30, doi: 10.1080/23120053.2017.1376558
- Mahmoud A.A., Mostafa A.E.H., Abdelrahman A.A., Elsfy A., 2019. Molecular Characterization of Shiga Toxin Producing *Escherichia coli* Isolated From Both Diarrheic and Apparently Health Calves. *JCVR*, **1** (2): 1-10, doi: 10.21608/jcвр.2019.56993
- Mainil J., 2013. *Escherichia coli* virulence factors. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **152**: 2-12, doi: 10.1016/j.vetimm.2012.09.032
- Mainil J., Fairbrother J., 2014. Pathogenic *Escherichia coli* in domestic mammals and birds. In: Pathogenic *Escherichia coli*: molecular and Cellular Microbiology (Ed. Morabito S), Caister Academic Press, Norfolk, UK, 19-43
- Mannan M.S., Sirazul F.R.M.G.K., Bayzid I.M., Islam Z.B.B.M.Z., Sarker M.S., Biswas P.K., 2021. Prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in buffaloes on smallholdings in coastal area in Bangladesh. *Thai J. Vet. Med.*, **51** (4): 691-696, doi: 10.56808/2985-1130.3167
- Mariani-Kurkdjian P., Bingen E., 2012. Physiopathologie et virulence des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxine. *Reanimation.*, **21** (3): 268-279, doi: 10.1007/s13546-012-0481-x
- Mellado M., Lopez E., Veliz F., De Santiago M., Macias-Cruz U., Avendaño-Reyes L., Garcia J., 2014. Factors associated with neonatal dairy calf mortality in a hot-arid environment. *Livest. Sci.*, **159**: 149-155, doi: 10.1016/j.livsci.2013.11.019
- Mensah S.E.P., Koudande O., Aboh B., Adjahoutonon K., Salifou S., Mensah G., Sanders P., et al., 2019. Evaluation des résidus de tétracyclines et de bêta-lactamines dans le lait de vache produit au Centre Bénin. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, **72** (4): 181-185, doi: 10.4314/jab.v80i1.9
- Monney J.D., Adjogoua E.V., Karamoko Y., Akran A., 2020. Incidences of Calf Diarrhea and the Associated Risk Factors in Ivory Coast (2015-2017). *Rev. Ciênc. Agrovet.*, **19** (4): 454-461, doi: 10.5965/223811711942020454
- Moxley R.A., Smith D.R., 2010. Attaching-effacing *Escherichia coli* infections in cattle. *Vet. Clin. Food Anim. Pract.*, **26** (1): 29-56. doi: 10.1016/j.cvfa.2009.10.011
- Nguyen T.D., Vo T.T., Vu-Khac H., 2011. Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Vietnam. *J. Vet. Sci.*, **12** (2): 159-164, doi: 10.4142/jvs.2011.12.2.159
- Olaogun S.C., Jeremiah O.T., Jubril A.J., Adewuyi O.O., 2016. Calf diarrhea: Epidemiological prevalence and bacterial load in Oyo and Ogun States, Nigeria. *Alex. J. Vet. Sci.*, **51** (1): 90-96, doi:10.5455/ajvs.232816
- Orden J., Ruiz-Santa-Quiteria J., Cid D., Garcia S., Sanz R., De La Fuente R., 1998. Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) and eae-positive non-VTEC in 1-30-days-old diarrhoeic dairy calves. *Vet. Microbiol.*, **63** (2-4): 239-248. doi: 10.1016/S0378-1135(98)00218-1
- Oswald E., Schmidt H., Morabito S., Karch H., Marches O., Caprioli A., 2000. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. *Infect Immun.*, **68** (1): 64-71. doi: 10.1128/IAI.68.1.64-71.2000
- Piérard D., De Greve H., Haesebrouck F., Mainil J.G., 2012. O157:H7 and O104:H4 Vero/Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: respective role of cattle and humans. *Vet. Res.*, **43**: 13, doi: 10.1186/1297-9716-43-13
- Ryu J.-H., Kim S., Park J., Choi K.-S., 2020. Characterization of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from pre-weaned calves in the Republic of Korea. *Acta Vet. Scand.*, **62** (1): 1-7, doi: 10.1186/s13028-020-00543-1
- Shams Z., Tahamtan Y., Pourbakhsh A., Hosseiny M.H., Kargar M., Hayati M., 2012. Detection of enterotoxigenic K99 (F5) and F41 from fecal sample of calves by molecular and serological methods. *Comp. Clin. Path.*, **21** (4): 475-478, doi: 10.1007/s00580-010-1122-2
- Smail N., Rezali L., Abdelhadi S., 2018. Etude préliminaire sur la mortalité de veaux âgés de 0 à 90 jours en région de Tiaret Algérie Ouest. *Livest. Res. Rural.*, **30**.
- Wani S., Hussain I., Fayaz I., Mir M., Nishikawa Y., 2009. Subtype analysis of stx1, stx2 and eae genes in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and typical and atypical enteropathogenic *E. coli* (EPEC) from lambs in India. *Vet. J.*, **182** (3): 489-490, doi: 10.1016/j.tvjl.2008.07.017
- Wudu T., Kelay B., Mekonnen H., Tesfu K., 2008. Calf morbidity and mortality in smallholder dairy farms in Ada'a Liben district of Oromia, Ethiopia. *Trop. Anim. Health Prod.*, **40** (5): 369-376, doi: 10.1007/s11250-007-9104-3
- Youssao A.K.I., Ahissou A., Idrissou N.D., Michaux C., Touré Z., Leroy P.L., 2001. Viabilité des bovins de race Borgou à la Ferme Elevage de l'Okpara au Bénin. *Tropicicultura.*, **19** (2): 65-69
- Zouagui Z., Elbay S., Alali S., Lbacha H.A., 2017. Diarrhées néonatales chez le veau au Maroc: prévalence des causes infectieuses majeures (*Escherichia coli* F5, Coronavirus, Rotavirus et Cryptosporidium parvum). *Rev. Maroc. Sci. Agron. Vet.*, **5** (2): 103-107, doi: 10.4142/jvs.2011.12.2.159

Summary

Boko K.C., Challaton K.P., Salifou C.F.A., Aguidissou N.O., Duprez J.N., Thiry D., Mainil J.G., Farougou S. Characterization of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from calves suffering from diarrhea in the Nikki commune of Benin

Diarrhea is one of the main pathologies encountered on cattle farms in Benin. Calves, the first and most affected link in the chain. The aim of this study was to assess the presence of virulence genes in *Escherichia coli* strains likely to cause diarrhea in calves, and their resistance profiles to common antimicrobials. To this end, 106 calves were monitored for two months after their birth in the commune of Nikki. 33 fecal samples were directly collected from the rectums of 33 calves suffering from diarrhea and subjected to bacteriological analysis. All collected samples were positive for *E. coli*. Characterization of the isolated *E. coli* strains isolated for the presence of virulence genes and factors *stx1*, *stx2*, *eae*, *sta*, F41 and F5 revealed the presence of *stx1* only, with a rate of 63.64%. *E. coli* strains carrying the *stx1* gene showed resistance profiles to the most commonly used antibiotics in Beninese farms: tetracycline (70%), amoxicillin clavulanic acid (50%) and colistin (50%). The presence of the *stx1* gene constitutes a source of contamination for animal products. Further studies are needed to perform serological typing and genome sequencing of *E. coli* strains. It would also be necessary to extend the sampling to other regions of Benin in order to better assess the status of farms with regard to *E. coli* strains isolated from calves and thus identify a possible zoonotic risk.

Keywords: Calves, digestive disorders, *Enterobacteriaceae*, pathogenicity, Benin

Resumen

Boko K.C., Challaton K.P., Salifou C.F.A., Aguidissou N.O., Duprez J.N., Thiry D., Mainil J.G., Farougou S. Caracterización de los genes de virulencia de cepas de *Escherichia coli* aisladas en terneros con diarrea del municipio de Nikki (Benín)

La diarrea es una de las principales patologías encontradas en la ganadería bovina de Benín. Los terneros, primeros eslabones de la cadena, son los más afectados. El objetivo de este estudio es evaluar la presencia de genes de virulencia en las cepas de *Escherichia coli* susceptibles de provocar diarrea en los terneros, así como sus perfiles de resistencia a los antimicrobianos usuales. Para ello, se realizó un seguimiento a 106 terneros durante los dos meses posteriores a su nacimiento en el municipio de Nikki. En total, se tomaron 33 muestras de materias fecales directamente del recto de 33 terneros afectados por diarrea, y se sometieron a análisis bacteriológicos. Todas las muestras resultaron positivas a *E. coli*. La caracterización de las cepas de *E. coli* aisladas para detectar la presencia de los genes y factores de virulencia *stx1*, *stx2*, *eae*, *sta*, F41 y F5, reveló la presencia del gen *stx1* únicamente, con una tasa del 63,64 %. Se realizaron ensayos de resistencia de las cepas de *E. coli* ante los antibióticos más utilizados en Benín: la doxiciclina (tasa de resistencia del 70 %), la amoxicilina + ácido clavulánico (50 %) y la colistina (50 %). Son necesarios estudios ulteriores para la tipificación serológica y la secuenciación del genoma de las cepas de *E. coli*. También sería necesario extender el muestreo a las otras regiones de Benín, para evaluar mejor el estado del ganado bovino ante estas cepas de *E. coli* aisladas en los terneros, y así identificar un eventual riesgo zoonótico.

Palabras clave: Ternero, Trastornos digestivos, *Enterobacteriaceae*, Patogenicidad, Benin